# 溶葡球菌酶在乳酸克鲁维酵母中重组表达、诱变、优化及酶学研究

王曦[1]，张光德[1]，陈熙明[2]，浦铜良[1*]

（1 兰州大学生命科学学院　兰州　730000　　2 中国科学院西北生态环境资源研究院　兰州　730000）

**摘要：**根据模仿葡萄球菌（Staphylococcus simulans）的溶葡球菌酶基因序列以及乳酸克鲁维酵母密码子偏好性设计引物扩增溶葡球菌酶基因表达片段，构建溶葡球菌酶（lysostaphin，Lys）基因表达载体（pKLAC1-Lys），转化乳酸克鲁维酵母（K. lactis GG799），实现了 Lys 基因的分泌表达。对重组菌株（K. lactis GG799/pKLAC1- Lys）进行 NTG 随机化学诱变，优化表达条件，筛选获得高表达菌株，并通过 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白并研究其酶学性质。结果表明：通过诱变重组溶葡球菌酶乳酸克鲁维菌株，Lys 酶比活性提高了约 5.2 倍（约 8000U/L）。最适接种量为 40g/L，诱导过程中每 24h 添加一次终浓度为 20g/L 的半乳糖和 $NH_4NO_3$ 可提高酶比活性，最适表达 pH 为 7.0-7.5，最适反应 pH 为 7.0-8.0，最适反应温度为 37℃。实验表明，低于 40℃，pH 3-6 之间时，重组溶葡球菌酶较稳定。$Sr^{2+}$对其酶活性有明显的促进作用，$Ba^{2+}$、$Ca^{2+}$、$Zn^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Mn^{2+}$、$Mg^{2+}$ 对其有明显的抑制作用。

**关键词：**乳酸克鲁维酵母　溶葡球菌酶　重组表达　诱变

# Heterologous Expression, Mutation, Optimizing the Expression Condition and Characterization of Lysostaphin in *Kluyveromyces lactis*

WANG Xi[1],ZHANG Guang-de[1] ,CHEN Xi-ming[2],PU Tong-liang[1*]

(1 School of Life Sciences,LanZhou University, lanzhou,730000, China)

(2 Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of

---

作者简介：王曦，女，硕士研究生，研究方向：主要从事微生物学研究。E-mail: wangxi2015@lzu.edu.cn;

*通信作者：浦铜良，男，汉族，副教授，硕士研究生导师，主要从事植物生理学研究。E-mail: tlpu@lzu.edu.cn;

基金项目：国家自然基金（31400437）；甘肃国际合作项目（1504WKCA097）

Sciences, Lanzhou, 730000, China )

**Abstract:** According to the sequence of lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans* and codon bias of *Kluyveromyces lactis* , the PCR primers were designed to amplify the fragment of lysostaphin gene. The fragment was inserted in pKLAC1, and transformed to *K. lactis GG799*. The *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys was cultivated to express Lys. We obtained a high expression strain (mu4#) by using powerful mutagen (N-methy1-N-nitro-N-nitrosoguanidine,NTG) on the recombinant and optimized the expression condition .The fermentation broth of mu4# was purified by Ni-NTA agarose and the enzyme characterization was studied. The result showed that the activity of Lys was approximately 5.2 times (8000U/L) higher in the mutation. The optimal inoculum dose of the mutant (mu4#) was 40g/L; Galactose and $NH_4NO_3$ (20g/L) were added in every 24 hours, Lys exhibited optimal expression at pH 7.0-7.5; Furthermore, the Lys enzyme optimal reaction performed at pH 7.0-8.0 and temperature at 37°C. The recombinant Lys was stable below 40 °C and pH between 3.0 and 6.0. $Sr^{2+}$ stimulated its activity whereas $Ba^{2+}$、$Ca^{2+}$、$Zn^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Mn^{2+}$、$Mg^{2+}$ inhibited the activities. This research accomplished Lys recombinant expression, yield improvement by chemical mutagenesis in *K. lactis* and characterization of lysostaphin. These research results provide profound guiding significance for the large-scale production and application of recombinant lysostaphin.



**Keywords:** *Kluyveromyces lactis*, lysostaphin, recombinant, mutation

溶葡球菌酶（lysostaphin，Lys）最初是由 Schlndler 与 Schuhardt 从一株命名为 NRRLB-2628 的模仿葡萄球菌的培养物中分离获得[1]，是一种 $Zn^{2+}$依赖的蛋白酶，能够特异性地水解葡萄球菌胞壁肽聚糖交联结构 Gly 五肽桥联。其相对分子质量约为 27 KDa，由 246 个 AA 组成的单链分子，pI 是 9.5，最适 pH 是 7.5。金黄色葡萄球菌是一种给人和动物健康带来严重危害的病原菌，能够使人体全身或局部发生感染，给临床治疗带来极大困难。此外，金黄色葡萄球菌主要引起奶牛乳房炎与子宫内膜炎，对乳业发展造成巨大损失。近年来，随着各种抗生素的大量应用，越来越多的耐药菌出现，引起了人们的广泛关注。其中金黄色葡萄球

菌对传统抗生素耐药性日益加重，以对甲氧西林产生耐药性的金黄色葡萄球菌（*methicillin-resistant S. aureus*, MRSA）为例，使得治疗由 MRSA 引起的感染变的极为困难，迫使寻找治疗 MRSA 的药物成为当务之急。有学者研究表明，Lys 能够治疗由 MRSA 引起的感染，并且没有耐药菌出现[2]，因此，溶葡球菌酶的药用潜力备受人们的重视。

目前而言，溶葡球菌酶已实现在大肠杆菌中成功表达。在大肠杆菌表达系统中，溶葡球菌酶大多以包涵体的形式出现，即宿主菌表达的目的蛋白在胞内相互聚集形成低活性的固体颗粒，属于细胞内不溶性表达，致使产物纯化极为困难，同时，大肠杆菌表达系统不完善的的翻译后加工修饰功能，比如，表达的目的蛋白，部分肽链在折叠过程中出现特异性错误聚合，致使形成完全解链或者未成熟的蛋白，使表达产物活性及表达量较低，此外，菌株的稳定性较差[3-4]不利于溶葡球菌酶的表达。毕赤酵母[5-6]在发酵过程中溶氧和甲醇需求量高，甲醇有毒，需要考虑表达产物的安全性问题，同时甲醇易燃存在安全隐患，发酵过程中可能发生爆罐，此外，发酵周期相对较长，容易污染[7-9]，给溶葡球菌酶大规模生产造成困难。

乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)是美国 FDA 认证的食品安全级酵母菌，相比蛋白表达系统，其优点如下：碳源利用种类多；繁殖快；可分泌大分子量蛋白；表达产物无需繁复的纯化过程；发酵过程中采用的诱导表达试剂为半乳糖或乳糖，无废气产生，不会出现爆罐现象，因此安全性较高，可用于异源蛋白高密度发酵进行大规模生产[10-13]。

目前，国内外关于溶葡球菌酶在乳酸克鲁维酵母表达系统中表达鲜有报道。本研究 Lys 基因在乳酸克鲁维酵母表达系统中重组表达，并对其进行 NTG 诱变[14-15]，筛选得到一株高效表达菌株，同时分析了酶学性质，为早日实现溶葡球菌酶的商业化提供相关理论指导。

## 1. 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 培养基：LB 培养基（g/L）：胰蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，氯化钠 10.0。YPD 培养基（g/L）：胰蛋白胨 20.0，葡萄糖 20.0，酵母提取物 10.0。YPGal 培养基（g/L）：半乳糖 20.0，胰蛋白胨 20.0，酵母提取物 10.0。YCB 培养基（g/L）：

葡萄糖 10.0，磷酸二氢钾 1.0，硫酸镁 0.5，氯化钠 0.1，氯化钙 0.1，精氨酸 1 mmol/L，赖氨酸 1 mmol/L， 维生素与微量元素，灭菌后加入乙酰胺 5 mmol/L。以上固体培养基需加琼脂 20.0 g。

1.1.2 菌株与质粒：大肠杆菌 DH5α 和金黄色葡萄球菌（*staphylococcus aureus*）菌株由本实验室保存，乳酸克鲁维酵母（*K. lactis GG799*）菌株由威尼斯大学生物技术研究所 Kestuis Sasnauskas 博士惠赠，PUC57，pKLAC1 载体购自 New England Biolabs 公司。

1.1.3 生化试剂和工具酶：PCR 引物合成与基因测序由北京莱兹生物工程有限公司完成；质粒提取试剂盒与胶回收试剂盒等购自上海生工生物工程有限公司；溶葡球菌酶标准品购自 SIGMA 公司；Ni-NTA 亲和层析柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司；XhoⅠ、KpnⅠ、SacⅡ及 T4 DNA ligase 购自杭州宝赛生物有限公司；试剂均为国产分析纯。

### 1.2 溶葡球菌酶基因克隆

根据模仿葡萄球菌（*Staphylococcus simulans*）溶葡球菌酶基因序列以及乳酸克鲁维酵母密码子偏好性设计引物，上下游引物中分别引入 xhoI 和 kpnI 两个酶切位点，PCR 引物 pKLAC1-F（5'-GTCTCGAGAAAAGAGCCGCA-3'）和 pKLAC1-R（5'- GCGGTACCTTAGTGGTGATG-3'），以引物 pKLAC1-F 与 pKLAC1-R 进行 PCR 扩增溶葡球菌酶基因表达片段。PCR 反应条件：94 ℃变性 5 min；94℃ 30 s，57℃ 40 s，72℃ 50 s，进行 35 个循环，4℃保存。PCR 反应体系如表 1 所示。PCR 扩增片段连接 PUC57 载体后转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞，筛选阳性单克隆，将筛选获得的转化子送至北京莱兹生物工程有限公司进行测序。

表 1. PCR 反应体系

Table 1. PCR reaction system

| $ddH_2O$ | 10 × Buffer（含 $Mg^{2+}$） | dNTPs（2.5mM） | P1 | P2 | Taq 酶 |
|---|---|---|---|---|---|
| 37.5 | 5 | 5 | 1 | 1 | 0.5 |

### 1.3 整合型表达载体 pKLAC1-Lys 构建

测序验证正确的质粒 PUC57-Lys，用限制性内切酶 XhoⅠ与 KpnⅠ酶切后

与使用相同酶切后的载体 pKLAC1 连接，转入大肠杆菌 DH5α，挑取转化子，提取质粒，经 Xho Ⅰ 与 Kpn Ⅰ 进行酶切验证，获得构建成功的整合型表达载体 pKLAC1-Lys。

1.4　整合型表达载体 pKLAC1-Lys 转化乳酸克鲁维酵母

提取重组质粒 pKLAC1-Lys，采用 Sac Ⅱ 酶对其线性化，琼脂糖凝胶浓缩回收，电击转化[16]乳酸克鲁维酵母(*K. lactis* GG799)，置 30 °C 恒温培养箱静置 2 h，涂 YCB 平板，30 °C 恒温培养 4 d 后，挑取阳性单克隆接种于 YPD 液体培养基摇瓶扩增繁殖，命名为 *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys。采用同样的电击转化方法将空载体 pKLAC1 转化 *K.lactis*GG799 菌株，作为阴性对照，命名为 *K.lactis* GG799/pKLAC1。

1.5 Lys 基因在 *K. lactis* GG799 中分泌表达

挑取 20 个阳性克隆，对其分别进行编号为：1 至 20#，分别接种于 5 mL YPD 液体培养基过夜培养，6000 r/min 离心 2 min，收集菌体，等量接种于 YPGal 液体培养基，30 ℃，220 r/min 恒温震荡培养，分别于 24、48、72、96 和 120 h 取样离心收集保存上清。采用比浊法测定 Lys 酶活。筛选得到 8#菌株为高表达菌株，命名为 *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8#。

1.6 定量测定 Lys 酶活

溶葡球菌酶活性测定参考[17]，采用比浊法对其进行测定，即规定 pH 7.5 条件下 37 ℃水浴 10 min 将金黄色葡萄球菌菌悬液 6 mL 从比浊度 ($A_{620}$ nm) 0.250 降至 0.125 所需酶的量为 1U 。本文根据溶葡球菌酶标准品绘制标准曲线，计算发酵液相应酶活。

1.7　*K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8# NTG 诱变

取 1.5 至 3 mL 的 *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8#菌液，6000 rpm 离心 1 min，弃上清，加 1 mL pbs，20 μL NTG，静置 40 min，用 1.5 mL pbs 冲洗，离心，弃上清，重复 3 遍，加入 5 mL YPD，30 ℃静置孵育 2 h，用 pbs 稀释至不同浓度，涂 YCB 平板。挑取 100 个转化子命名为 1 至 100#，菌体收集与转接方法同 1.5。定量测定发酵上清液酶活，判断诱变菌株的表达能力。筛选得到 4#诱变菌株的表达能力最强，将其命名为 mu4#。

1.8　mu4#生长曲线测定

每 24h 收集摇瓶发酵液，稀释后于波长 600nm 处测定吸光值，$OD_{600}$=$OD_{600}$读数×稀释倍数。

1.9　mu4#表达条件优化

1.9.1 不同起始量对酶活的影响：将 mu4# 接种于 YPD 液体培养基，30 ℃，220 r/min 持续震荡过夜，离心收集菌体，分别以 5 g/L、10 g/L、20 g/L、40 g/L、80 g/L、160 g/L 的终浓度接种于 5 mL YPGal，分别在 24、48、72、96 和 120 h 取上清 400 μL，12000 r/min 离心 2 min，收集保留上清，测定酶活。

1.9.2 不同时间段半乳糖添加对酶活的影响：将 mu4#以 40 g/L 的接种量接种于 5 mL YPGal 液体培养基，30 ℃，220 r/min 震荡培养，分别于 24、48、72 与 96 h 补终浓度为 20 g/L 的半乳糖进行诱导表达，分别在 24、48、72、96 和 120 h 取上清 400 μL，12000 r/min 离心 2 min，收集保存上清，检测酶活。

1.9.3 不同时间段氮源添加对酶活的影响：将 mu4#以最适接种量和半乳糖添加量接种于 5 mL YPGal 液体培养基，30 ℃，220 r/min 震荡培养，分别于 24、48、72 与 96 h 补终浓度与上述半乳糖等量的 $NH_4NO_3$，分别在 24、48、72、96 和 120 h 取上清 400 μL，12000 r/min 离心 2 min，收集保存上清，检测酶活。

1.9.4 不同 pH 对酶活的影响：将 mu4# 以最适接种量和半乳糖添加量接种于 5 mL YPGal 液体培养基，加入终浓度为 1M 的磷酸盐缓冲液，磷酸盐缓冲液设置以下几个梯度：5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5，220 r/min，30 ℃恒温振荡培养，分别在 24、48、72、96 和 120 h 离心收集保存上清，测酶活。

2.0 表达产物的纯化及鉴定

离心收集发酵液上清，利用 Ni-NTA 亲和层析柱对其进行纯化，收集洗脱液。取纯化后蛋白溶液进行 SDS-PAGE 电泳（分离胶 12％，浓缩胶 4％），加入 5×上样缓冲液，95℃煮沸 5 min，上样 10 μL 进行电泳，考马斯亮蓝 R250 法染色 2 h，脱色 3 h，观察分析。

2.1 溶葡球菌酶酶学性质

2.1.1 反应最适 pH 及 pH 稳定性测定：

分别用 1 M pH 3.0、4.0、5.0、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，1 M pH 7.0、8.0 的磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液以及 1 M pH 9.0、10.0、11.0 的 Tris-HCl 缓冲液，作用于发酵上清液，于 620 nm 处测定吸光值，计算酶活，以最高酶活作

为 100%计算其相对酶活。

将发酵液上清分别置于上述相应的 pH 缓冲液中，分别作用 1 h，2 h，3 h，并在 pH 7.5 条件下测残余酶活，以最高酶活作为 100 %计算其相对酶活。

2.1.2 反应最适温度及热稳定性测定：

溶葡球菌酶发酵上清液分别置于 20、25、30、35、37、40、45、50 °C 条件下反应 30 min，测酶活，以最高酶活作为 100 %计算其相对酶活。

将酶液分别置于 40、50、60 °C 分别水浴 30 min 和 1 h，然后 37 °C 反应测定剩余酶活，并以未保温时的酶活作为 100 %计算其相对酶活。

2.1.3 二价金属阳离子对酶活的影响：

分别添加 $SrCl_2$、$BaCl_2$、$CaCl_2$、$ZnCl_2$、$CuCl_2$、$MnCl_2$、$MgCl_2$ 二价金属离子至终浓度为 0.5、1.0、2.0 mmol/L ，测定酶活，以未添加金属阳离子的发酵液上清酶活 100%作为对照，计算其相对酶活。

## 2. 结果与分析

### 2.1 溶葡球菌酶基因扩增片段与分析

Lys 基因 PCR 扩增片段如图 1 所示，在 770 bp 左右出现单一扩增片段，与目的片段基本相一致。

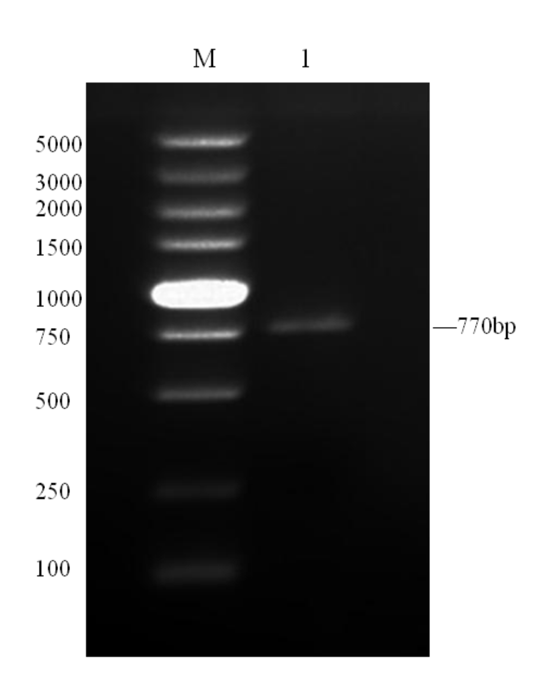



图 1. PCR 扩增 Lys 基因琼脂糖凝胶电泳

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of Lys. M:DNA marker; 1: PCR product of *Lys*.

### 2.2 整合型表达载体 pKLAC1-Lys 构建

如图 2 所示，溶葡球菌酶基因与整合型表达载体 pKLAC1 的构建图谱。将测序正确的质粒 PUC57-Lys 经限制性内切酶 XhoⅠ与 KpnⅠ双酶切后与采用相同酶切后的载体 pKLAC1 相连接，转入大肠杆菌 DH5α，挑取阳性单克隆，提质粒，经双酶切验证，如图 3 所示，和预想结果相一致，说明表达载体 pKLAC1-Lys 构建成功。

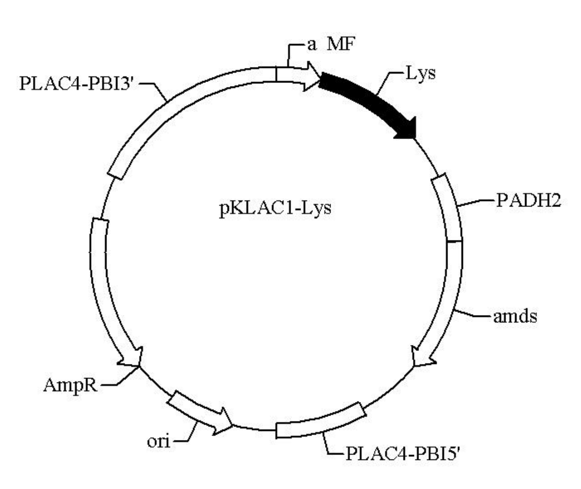



图 2. 表达载体 pKLAC1-Lys 结构

Fig.2 Structure of expression vector pKLAC1-Lys

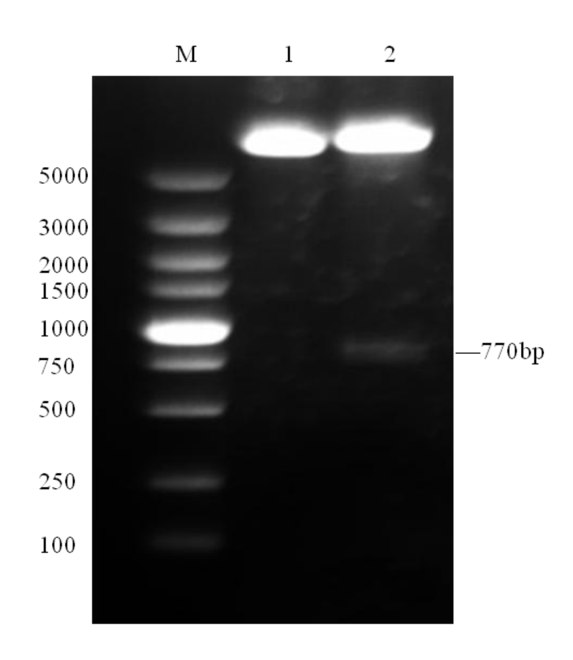



图 3. 表达载体 pKLAC1-Lys 酶切鉴定

Figure 3. The enzyme identification of pKLAC1−bcplc.

M: DNA marker; lane 1：expression vector pKLAC1-Lys；lane 2: expression vector pKLAC1-Lys digested by XhoⅠand KpnⅠ.

## 2.3 表达载体 pKLAC1-Lys 转化乳酸克鲁维酵母

pKLAC1 为乳酸克鲁维酵母（*K. lactis*）整合型表达载体，转化前需对其线性化，使其能够与 *K. lactis* 基因组（DNA）产生同源重组。Sac II 酶切后载体分为两部分，如图 4 所示，胶回收较大片段，电击转化 *K. lactis* 后涂布 YCB 平板(含 5 mM 乙酰胺)。YCB 平板不含酵母生长所需氮源，而 pKLAC1 载体携带 amds 基因，只有线性化 pKLAC1-Lys 片段整合到乳酸克鲁维酵母基因组中，可使含有转化子的菌株分解利用 YCB 平板上的乙酰胺，从而为其自身生长提供必需的氮源，阳性克隆才得以在 YCB 平板上生长，以此对转化子做出筛选。采取同样的方法将不含目的基因的载体 pKLAC1 转化 *K. lactis* GG799，获得阳性克隆作为对照菌株。

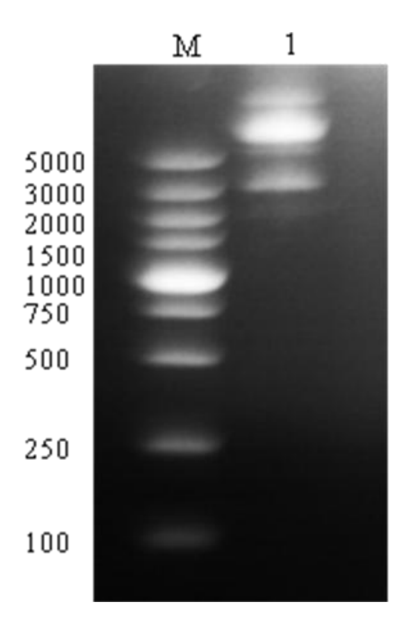



图 4. 表达载体 pKLAC1-Lys 单酶切

Figure 4. Single enzyme digestion of pKLAC1−bcplc.

M: DNA marker; lane 1：expression vector pKLAC1-Lys digested by Sac II

2.4　Lys **基因在** *K. lactis* GG799 **中分泌表达**

紫外分光光度法检测 Lys 抑菌活性：Lys 基因在 *K. lactis* GG799 中分泌表达，收集 *K. lactis* GG799/pKLAC1-Lys 菌株不同时间发酵上清液，检测 Lys 酶活，如图 5 所示。由图 5 可知，*K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 成功分泌产生了有活性的 Lys，该酶水解 LB 中的金黄色葡萄球菌，从而使 $A_{620}$ 值下降，而对照菌株（*K. lactis* GG799/pKLAC1）的发酵液上清未使 $A_{620}$ 值降低，说明对照菌株未表达 Lys。该酶从 24 h 到 72 h，随着表达的持续，酶活性呈上升趋势，72h 酶活达到最高

（1538U/L），96 h 后酶活逐渐下降。总体而言，*K.lactis* GG799/pKLAC1- Lys 菌株分泌表达的溶葡球菌酶酶活较低，为了进一步提高 Lys 的酶活，对 K.lactis GG799/pKLAC1- Lys 菌株采用 NTG 随机诱变的方式，筛选高表达菌株。

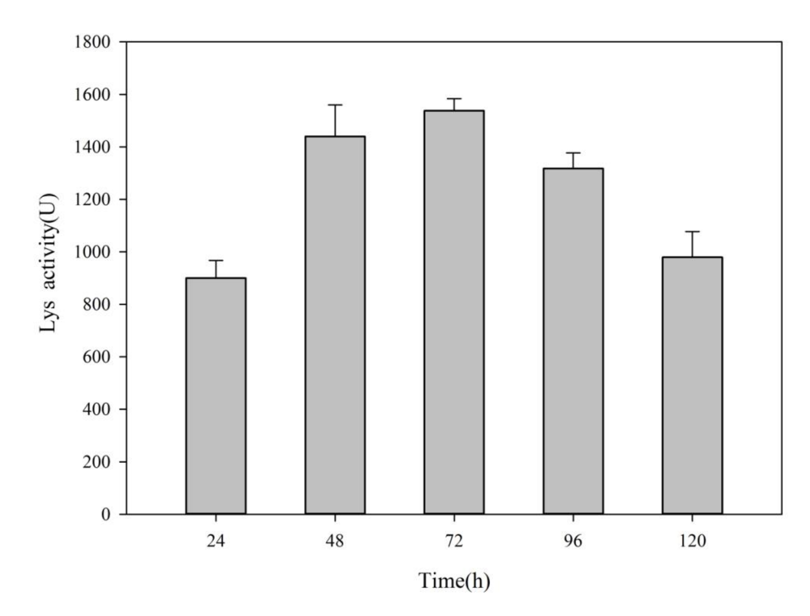



图 5. *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8#不同诱导时间溶葡球菌酶酶活

Figure 5.The Lys enzyme activity of *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8# during the induction by the galactose

2.5 *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8# NTG 诱变

*K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8# NTG 诱变后，检测 Lys 酶活。实验结果表明，诱变菌株 4#的表达能力最强，酶活最高为（3086 U/L），如图 6 所示。该酶从 24 h 到 48 h 酶活呈上升趋势，48 h 酶活最高，48 h 之后酶活在不断下降。与诱变前菌株相比诱变后酶活提高了 2 倍左右。

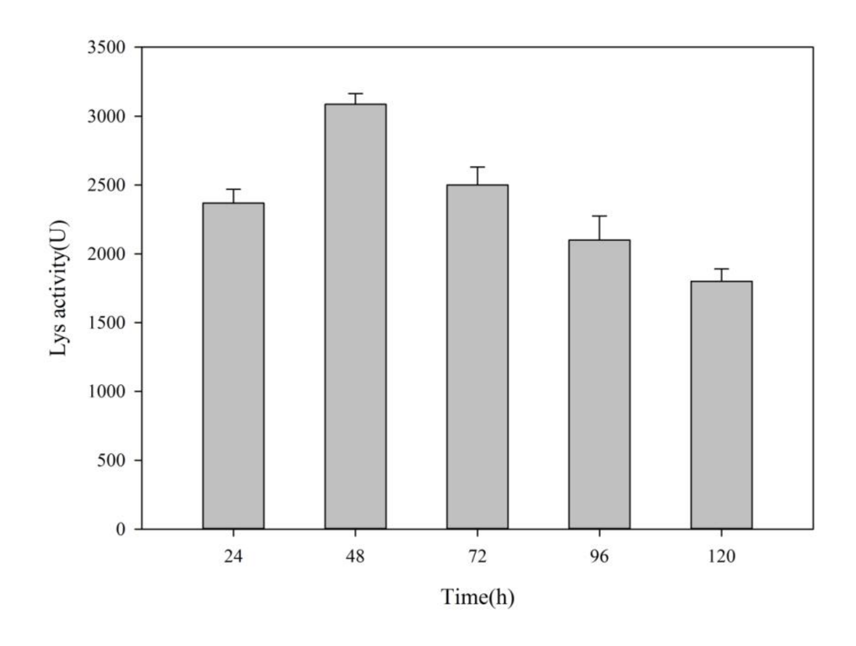



图 6. mu4#不同诱导时间溶葡球菌酶的酶活

Figure 6. The Lys enzyme activity of mu4# during the induction by the galactose

## 2.6　mu4#生长曲线

mu4#在摇瓶发酵过程中菌体生长曲线如图 7 所示。24 h 时 mu4#接种于培养基处于适应期，所以此时的 $OD_{600}$ 较低，经过调整期的准备，48 h 时菌体生长速度快速增加，到达 72 h 时进入稳定期，96 h 时生长速度略微上升，120 h 菌体 $OD_{600}$ 下降进入衰亡期。

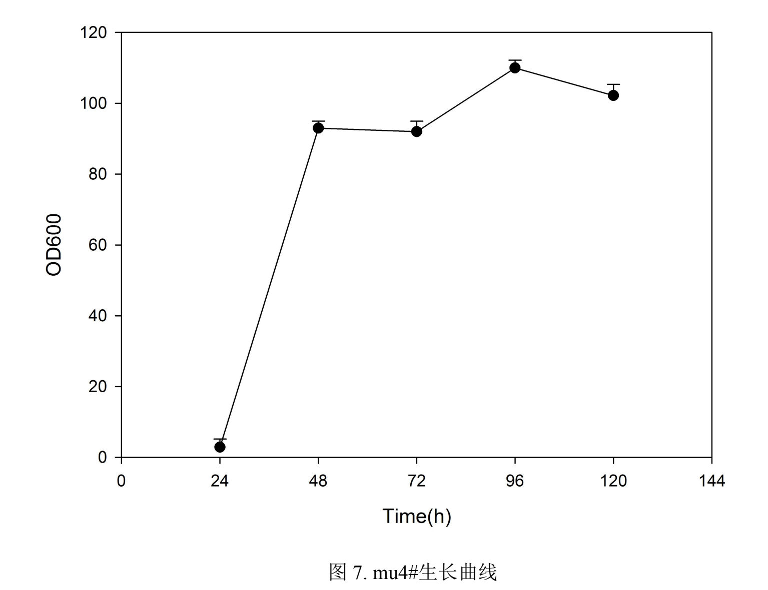



图 7. mu4#生长曲线

Figure 7.The growth curve of mu4#

2.7 mu4#表达条件优化

2.7.1 不同起始量对酶活的影响：在一定体积的培养基中，接种量会直接影响酶的表达量和活性。接种量过高，后期酵母生长营养不足，就会降解自身产生的蛋白，用于维持自身新陈代谢。接种量过低，会使营养利用不充分，表达量低，酶活相应也会下降。如图 8 所示，接种量从 5 g/L 提高到 10 g/L 时，从 24 h 至 48 h 酶活有所提高，48 h 以后酶活呈缓慢下降趋势。接种量从 20 g/L 提高到 160 g/L 时，在 24 h 时酶活明达到最高，随着表达时间的增加，各自的酶活呈不同水平下降趋势。其中 40 g/L 的起始接种量酶活力最高，因此，下面的实验均选择接种量为 40 g/L。

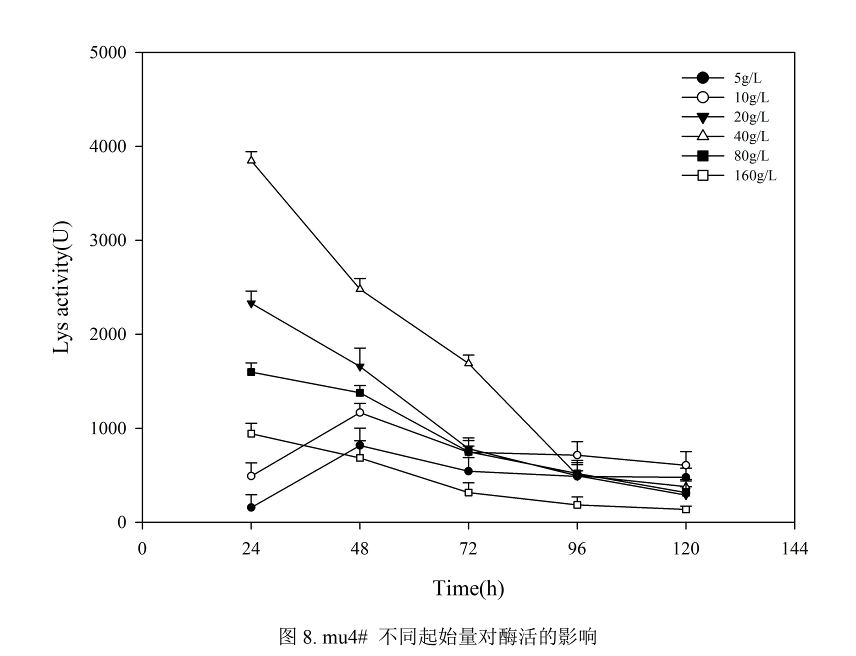



图 8. mu4# 不同起始量对酶活的影响

Figure 8. different initial inoculum dosage of mu4# on Lys activity

2.7.2 不同时间段半乳糖添加对酶活的影响：

溶葡球菌酶在诱导表达过程中，半乳糖作为唯一碳源，半乳糖的含量会对溶葡球菌酶的表达量和酶活产生一定影响。由图 9 分析可知，不同时间段添加半乳糖，从 24 h 至 48 h 酶活力大幅提高，48 h 之后呈不同程度的下降趋势。随着半乳糖添加次数的增多，酶活下降的幅度越小。由此可见，在诱导过程中增加半乳糖的补加量，前期分泌的溶葡球菌酶活性就越高。因此，以下实验均采用每 24 h 添加一次终浓度为 20 g/L 的半乳糖。

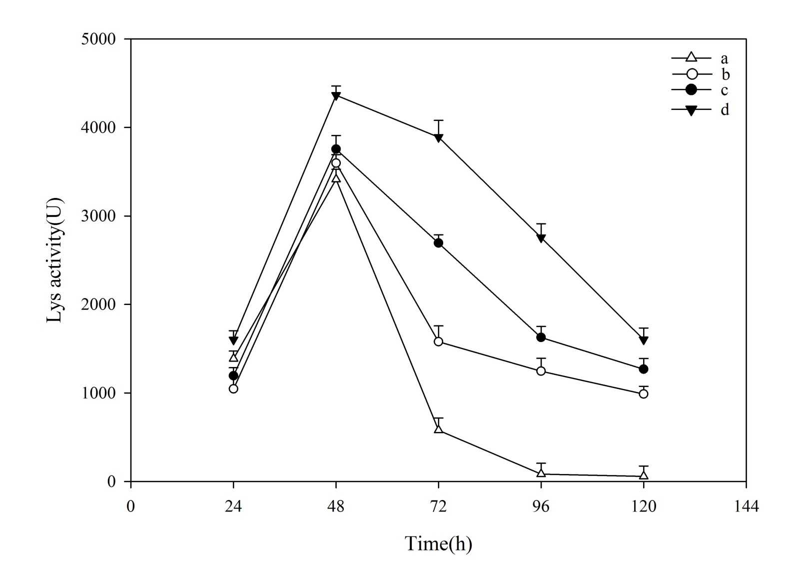



图 9. mu4#不同时间半乳糖添加量对酶活的影响

a：在 24h 添加终浓度为 20 g/L 的半乳糖； b：在 24h 和 48h 分别添加终浓度为 20 g/L 的半乳糖；c：在 24h、48h 和 72 h 分别添加终浓度为 20 g/L 的半乳糖；d：在 24h、48h、72 h 和 96 h 分别添加终浓度为 20 g/L 的半乳糖.

Figure 9. Galactose addition of mu4# on Lys activity at different times

a：The addition of galactose at the final concentration of 20 g/L in 24h; b: The addition of galactose at the final concentration of 20 g/L in 24h and 48h respectively; c: The addition of galactose at the final concentration of 20 g/L in 24h 、48h and 72h respectively; d: The addition of galactose at the final concentration of 20 g/L in 24h 、48h 、72h and 96h respectively;

2.7.3 不同时间段氮源添加对酶活的影响：

溶葡球菌酶在诱导表达过程中，氮源的含量会对溶葡球菌酶的表达量和酶活产生一定影响。由图 10 分析可知，不同时间段添加 $NH_4NO_3$，从 24 h 至 48 h 酶活力大幅提高，48 h 之后呈不同程度的下降趋势。随着 $NH_4NO_3$ 添加量的增多，酶活下降的幅度越小。与图 9 对比分析，发现在 24h 和 48h 的酶活没有变化，说明此阶段的氮源是充足的，48h 之后各个时期的酶活相对有所提高，说明图 9 中 48h 之后酶活的下降，部分原因是由氮源不足引起的，同时也受菌体生长的影响。

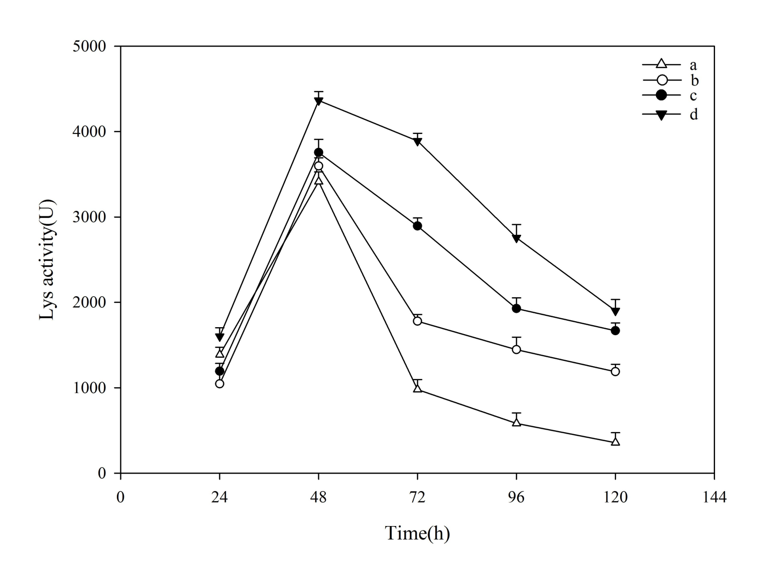



图 10. mu4#不同时间氮源添加对酶活的影响

a：在 24h 添加终浓度为 20 g/L 的 $NH_4NO_3$； b：在 24h 和 48h 分别添加终浓度为 20 g/L 的 $NH_4NO_3$；c：在 24h、48h 和 72 h 分别添加终浓度为 20 g/L 的 $NH_4NO_3$；d：在 24h、48h、72 h 和 96 h 分别添加终浓度为 20 g/L 的 $NH_4NO_3$.

Figure10. nitrogen source addition of mu4# on Lys activity at different times

a：The addition of $NH_4NO_3$ at the final concentration of 20 g/L in 24h; b: The addition of $NH_4NO_3$ at the final concentration of 20 g/L in 24h and 48h respectively; c: The addition of $NH_4NO_3$ at the final concentration of 20 g/L in 24h 、48h and 72h respectively; d: The addition of $NH_4NO_3$ at the final concentration of 20 g/L in 24h 、48h 、72h and 96h respectively;

2.7.4 不同 pH 对酶活的影响：

pH 对酶活性产生一定的影响，pH 过高或者过低都会降低酶与底物的结合程度，进而影响酶的活性。由图 11 可知，pH 从 5.0 提高到 8.0 的过程中，酶活呈不同程度的升高。pH 为 8.5 时，酶活力骤降。在 pH 为 7.0-7.5 时酶活力较高，大约为 8000U/L。因此该酶适合在偏中性的 pH 范围内分泌表达。

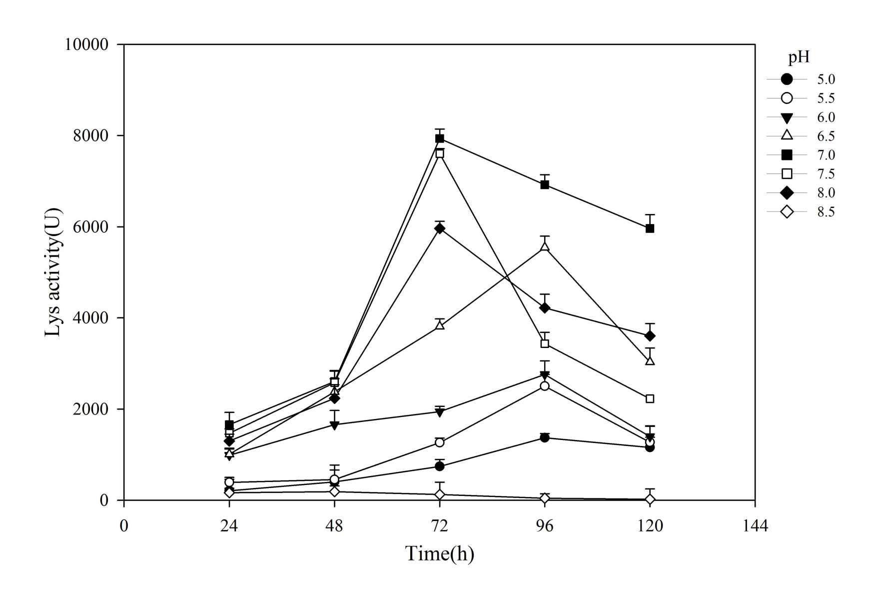



图 11. mu4# 不同 pH 对酶活的影响

Figure 11. The effect of different pH on mu4# Lys activity

2.8 表达产物的纯化及鉴定

为了进一步研究重组溶葡球菌酶表达情况，对发酵液进行纯化，对纯化产物进行 SDS-PAGE 电泳检测。如图 12 所示，27 kDa 附近出现相应条带，与预测的溶葡球菌酶分子量一致[18]，说明重组溶葡球菌酶在乳酸克鲁维酵母中实现了分泌表达。

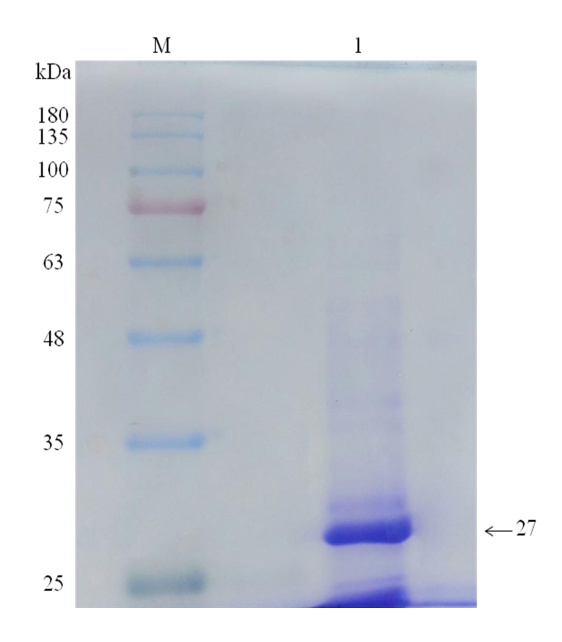



图 12. mu4#发酵液 SDS-PAGE 分析

Figure 12. SDS-PAGE analysis of mu4# from fermentation broth

2.9　溶葡球菌酶酶学性质

2.9.1 反应最适 pH 及 pH 稳定性测定：

pH 的变化不但影响酶的活性，还会影响酶的稳定性。由图 13 分析可知，在 pH 3.0-8.0 之间时，随着 pH 的增大酶的相对活性在不断上升，pH 大于 8.0 时酶的相对活性骤降。表明该酶最适反应 pH 在 7.0-8.0 范围内，因此该酶适合在偏中性的 pH 范围内发挥作用。

由图 14 可知，以每个时间段的最高酶活作为 100%计算其相对酶活，发现 pH 在 3-6 范围内时酶活在 80%以上，pH 大于 7 时，相对酶活迅速下降，低于 40%以下，并且随着 pH 的增大，呈下降趋势。说明重组溶葡球菌酶在 pH 3-6 范围内，酶活比较稳定，即该酶的耐酸性能好。

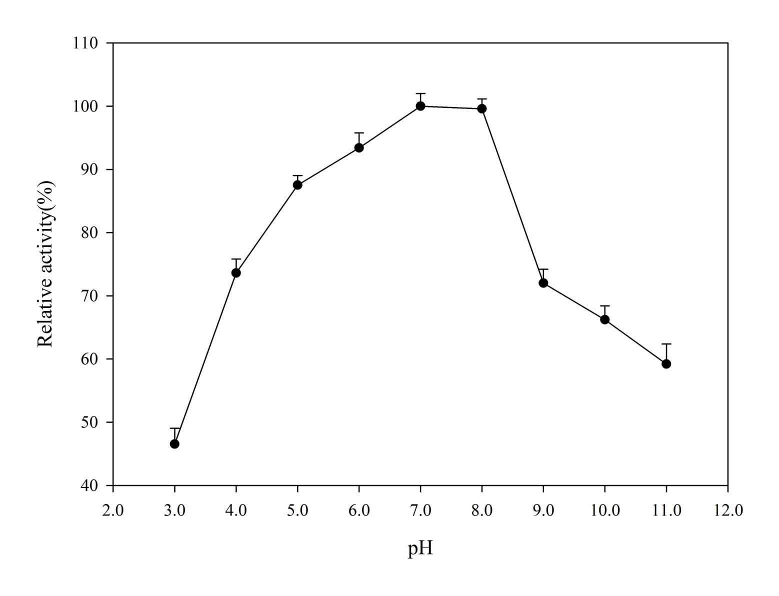



图 13. 溶葡球菌酶反应最适 pH

Figure 13. the optimum reaction PH of Lys

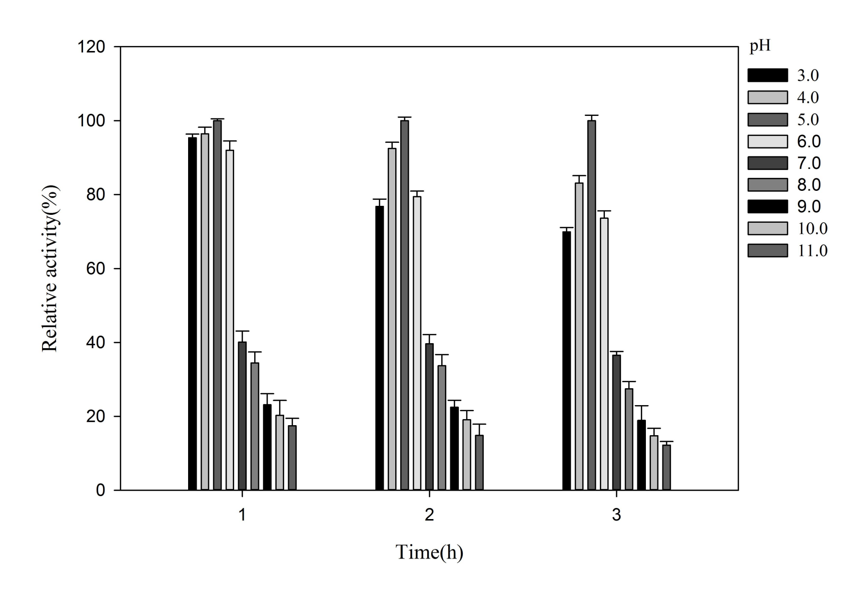



图 14. 溶葡球菌酶 pH 稳定性

Figure 14. pH stability of Lys

2.9.2 反应最适温度及热稳定性测定：

温度对酶活会产生一定的影响。温度过低会使反应活化分子数降低，酶促反应速率相应减慢。温度过高会使酶在短时间内变性失活，会使酶促反应速率变慢。由图 15 分析可知，Lys 最适反应温度为 37 °C，在 20−30 °C 酶活较低，随着温度的上升酶活大幅提高，在 37 °C 时达到最高，超过 37 °C 酶活力快速下降。

由图 16 可知，该酶在 30、40、50、60 °C 条件下分别水浴 30 min 与 1 h，当温度高于 40 °C 时，酶的相对残余活力低于 40 %以下，酶活力损失严重。由此可见，该重组溶葡球菌酶的热稳定性较差。

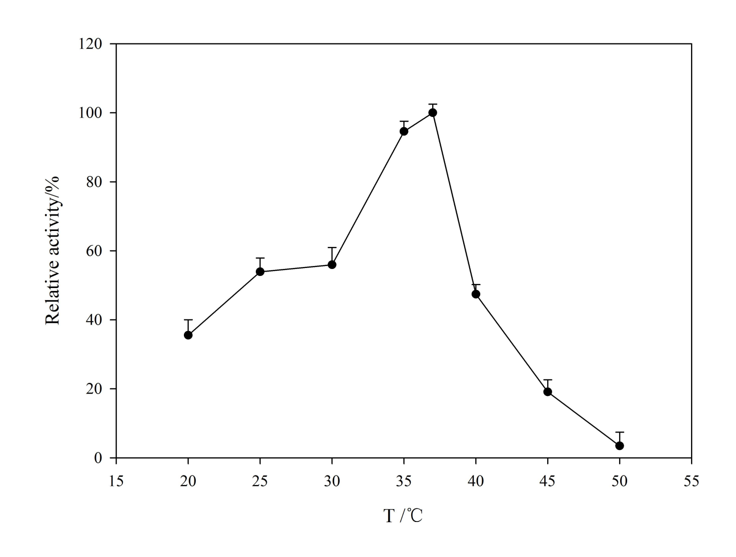


图 15. 溶葡球菌酶反应最适温度

Figure 15. the optimum reaction temperature of Lys

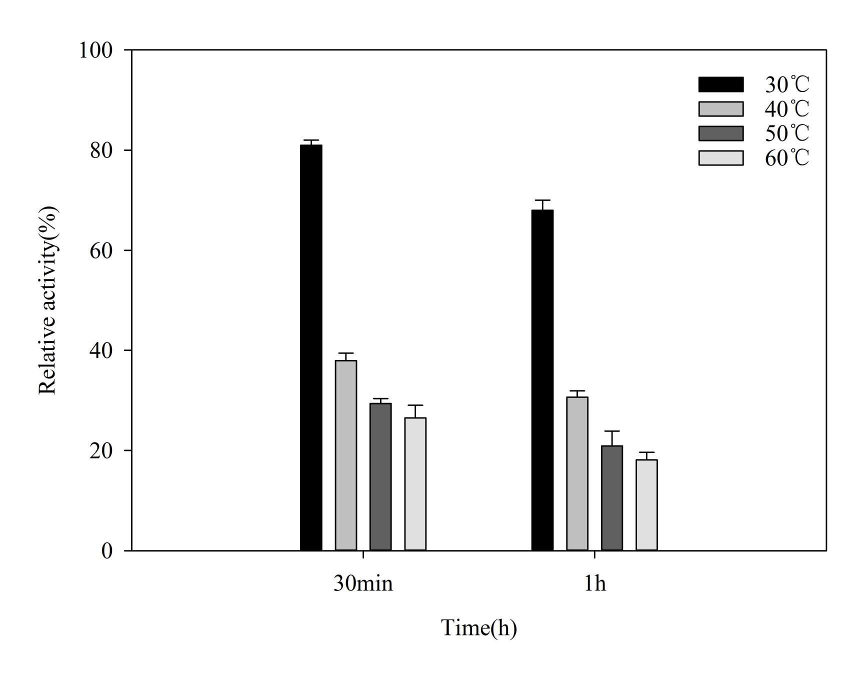



图 16. 溶葡球菌酶热稳定性

Figure 16. The thermostability of Lys



2.9.3 二价金属阳离子对酶活的影响：

由图 17 可知，$Sr^{2+}$对其有明显的促进作用；$Ba^{2+}$、$Ca^{2+}$、$Zn^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Mn^{2+}$随着金属阳离子浓度的增大对其抑制作用逐渐加强，$Mg^{2+}$随着金属离子浓度的增大对其抑制作用逐渐减弱。

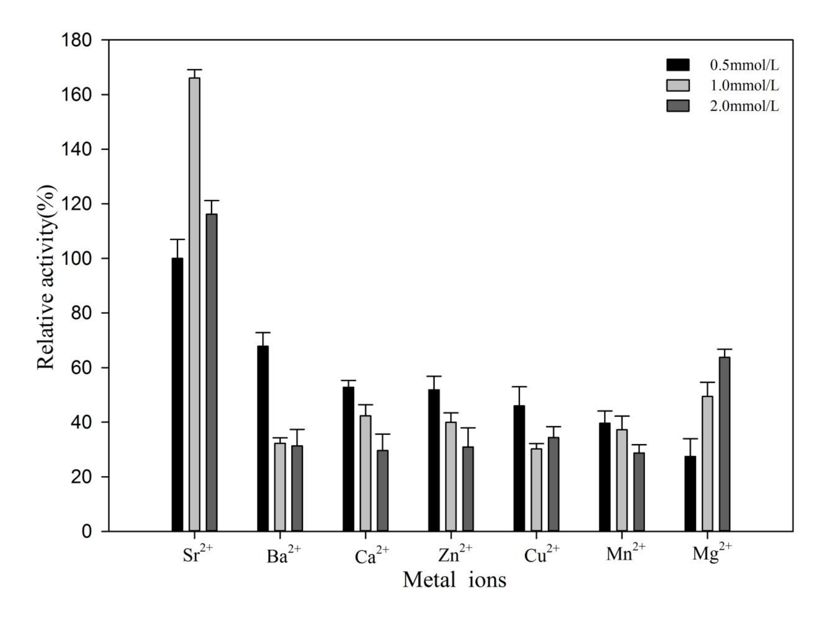



图 17. 不同二价金属阳离子对溶葡球菌酶酶活的影响

Figure 17.The Effect of different divalent mental ions on Lys enzymes activity

## 3 讨论与结论

金黄色葡萄球菌是一种对人与牲畜健康构成严重威胁的病原微生物，可引起人体全身或局部感染，给临床治疗带来极大困难，此外，引起奶牛乳房炎[19]与子宫内膜炎[20-21]，给乳业发展带来重大的损失。近年来，由于抗生素的大量使用，多种耐药菌的出现逐渐引起人们的关注，因此，寻找一种不产生耐药性的新药物是我们的研究重心。有研究表明，溶葡球菌酶对金黄色葡萄球菌（尤其是 MRSA）有很好疗效，并且不产生耐药性，同时在动物体内无残留，对机体正常组织无刺激、无致突变性，安全有效。因此，对溶葡球菌酶的研究备受人们的关注，使其再次成为研究新热点。

目前，用于表达溶葡球菌酶的菌株大多存在病原性以及安全性隐患，因此，构建具有食品安全级的菌株显得尤为重要。研究表明，溶葡球菌酶在大肠杆菌和毕赤酵母表达系统中已实现成功表达。大肠杆菌表达的蛋白，纯化难度大，活性低，菌株稳定性差。毕赤酵母是甲醇诱导型表达，诱导过程中有毒性甲醇的添加会给发酵产物的安全性带来隐患，同时甲醇易燃，可能发生爆罐。乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)为美国 FDA 认证的食品安全级酵母菌，因此，在食品、饲料及医药领域，可利用乳酸克鲁维酵母大规模生产异源蛋白，实现商业化。

本实验实现了对来源于模仿葡萄球菌的溶葡球菌酶在乳酸克鲁维酵母中高效

表达、诱变、表达条件优化并通过 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白及酶学性质研究。成功实现了溶葡球菌酶基因在乳酸克鲁维酵母中表达，结果表明表达产物活性较低，为了进一步提高溶葡球菌酶的表达活性，对其进行 NTG 随机诱变，结果发现酶活明显提高。优化诱变后菌株表达条件，结果表明最适接种量为 40 g/L，诱导过程中每 24 h 添加一次终浓度为 20 g/L 的半乳糖，可防止前期表达蛋白降解，每 24 h 添加一次终浓度为 20 g/L 的氮源，能降低后期酶活下降的速度。最适表达 pH 为 7.0-7.5，酶活约为 8000 U/L。mu4#优化表达条件后相比原始菌株 *K. lactis* GG799/pKLAC1- Lys 8#酶活提高了约 5.2 倍。SDS-PAGE 电泳分析表明，重组溶葡球菌酶成功实现了分泌表达。酶学性质分析表明：最适反应 pH 为 7.0-8.0，最适反应温度为 37 ℃，低于 40 ℃，pH 3-6 之间时，重组溶葡球菌酶较稳定。$Sr^{2+}$ 对酶活性有明显的促进作用；$Ba^{2+}$、$Ca^{2+}$、$Zn^{2+}$、$Cu^{2+}$、$Mn^{2+}$、$Mg^{2+}$ 对酶活性有明显的抑制作用。综上所述，乳酸克鲁维酵母在表达异源蛋白方面存在其独特优势， 因此将乳酸克鲁维酵母表达系统作为表达外源蛋白的宿主，对大量生产药用蛋白具有一定的指导作用，同时也显示出在医药领域具有更加广阔的应用前景。

**致谢** 感谢我的导师浦铜良老师和中国科学院西北生态环境资源研究院陈熙明老师的悉心指导和帮助。

## 参考文献

[1] Schindler CA,Schuhardt VT. Lysostaphin: A new bacteriolytic agent fosr the staphylococcus. Proc Natl Acad Sci USA,1964,51(3):414-421.

[2] Szweda P, Schielmann M, Kotlowski R, et al.Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against Staphylococcus aureus. Appl Microbiol Biotechnol , 2012, 96(5):1157–1174.

[3] Szweda P, Gorczyca G, Filipkowski P, et al. Eficient Production of Staphylococcus simulans Lysostaphin in Benchtop Bioreactor by Recombinant Escherichia coli. Preparative Biochemistry and Biotechnology,2014,44(4) : 370-381.

[4] Farhangnia L, Ghaznavi- Rad E, Mollaee N, et al. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Lysostaphin From Staphylococcus simulans. Jundishapur J Microbiol,2014,7(5): e10009.

[5] Zhao H, Blazanovic K, Choi Y, et al. Gene and Protein Sequence Optimization for High-Level Production of Fully Active and Aglycosylated Lysostaphin in Pichia pastoris. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2746–2753.

[6] Schotte P, Dewerte I, Groeve MD, et al. Pichia pastoris MutS strains are prone to

misincorporation of O-methyl-l-homoserine at methionine residues when methanol is used as the sole carbon source. Microbial Cell Factories, 2016,15(1):1-9.

[7] 杨梅,温真，林丽玉,等. 毕赤酵母蛋白表达系统研究进展. 生物技术通报，2011,(4):46-51.

Yang M,Wen Z, Lin LY, et al. Advances of Expression System of Pichia pastoris Protein. Biotechnology Bulletin, 2011,(4):46-51.

[8] 傅小蒙,孔令聪,裴志花,等. 毕赤酵母表达系统优化策略概述.中国生物工程杂志,2015,35(10):86-90.

Fu XM,Kong LC,Pei ZH, et al. Advance in the Research of Antimicrobial Peptides Gene Expression in Pichia pastor. China Biotechnology, 2015,35(10):86-90.

[9] 黄雪月,张梁,李赢,等. 黑曲霉阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的组成型表达. 微生物学通报，2017, 44(1):68-78.

Huang XY, Zhang L, Li Y, et al. Constitutive expression of feruloyl esterase from A spergillus niger in Pichia pastoris .microbiol china, 2017, 44(1):68-78.

[10] 肖超，张梁，李颜颜,等. 蜡样芽胞杆菌磷脂酶C在乳酸克鲁维酵母中重组表达、纯化及酶学性质分析. 微生物学报，2017,57(1):87-96.

Xiao C, Zhang L,Li YY, et al. Heterologous expression, purification and characterization of phospholipase C from Bacillus cereus in Kluyveromyces lactis. Acta Microbiologica Sinica, 2017,57(1):87-96.

[11] van Ooyen AJJ, Dekker P, Huang M, et al. Heterologous protein production in the yeast Kluyveromyces lactis. FEMS Yeast Research,2006, 6(3): 381–392.

[12] van den Berg JA, van den Laken KJ, van Ooyen AJJ, et al. Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. Biotechnology, 1990, 8(2): 135–139.

[13] Swinkels BW, van Ooyen AJJ, Bonekamp FJ. The yeast Kluyveromyces lactis as an efficient host for heterologous gene expression. Antonie van Leeuwenhoek, 1993, 64(2):187–201.

[14] Xin-Zhou HE, Zhao DF, Huang HF, et al. Screening of Propionibacterium shermanii Strains with High Production Antibacterial Metabolites by NTG Mutation. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016.

[15] 郭玮婷，张慧，查东风,等. 产耐高温谷氨酰胺转胺酶菌株的快速筛选方法.中国生物工程杂志，2015, 35(8):83-89.

Guo BT, Zhang H , Zha DF, et al. A Rapid Method of Screening for Thermostable Transglutaminase from Streptomyces mobaraensis. China Biotechnology, 2015, 35(8):83-89.

[16] 袁伟，柯涛，杜敏华,等.牛凝乳酶原基因的合成及其在乳酸克鲁维酵母中的表达. 生物工程学报，2010, 26(9):1281-1286.

Yuan W, Ke T, Du MH, et al. Gene synthesis of the bovine prochymosin gene and high-level expression in Kluyvermyces lactis. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(9):1281-1286.

[17] 杨信怡,游雪甫,蒋建东.溶葡球菌酶研究进展.中国生化药物杂志，2005, 26(6):372-374.

Yang XY,YouXF,Jiang JD.Advances in lysostaphin research. Chinese Journal of Biochemical Pharmaueuties, 2005, 26(6):372-374.

[18] 王永，刘沐荣，万海同,等. 聚乙二醇修饰重组溶葡球菌酶的初步研究.中国生物工程杂志，2013, 33(6):12-17.

Wang Y,Liu MR,Wan HT, et al. Chemical Modification of Lysostaphin with Activated Polyethlene Glycol. China Biotechnology, 2013, 33(6):12-17.

[19] Hoernig KJ, Donovan DM, Pithua P, et al. Evaluation of a lysostaphin-fusion protein as a dry-cow therapy for Staphylococcus aureus mastitis in dairy cattle. American Dairy Science Association, 2016, 99( 6):4638–4646.
[20] 袁怀兵.重组溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的疗效研究.当代畜禽养殖业,2013,12(19):6-7.
Yuan HB. The Study of Recombinant Lysostaphin on Treatment Trial of Endometritis in Dairy Cattle. Modern Animal Husbandry, 2013,12(19):6-7.
[21] 陆锦春,陈华鹏,马怀彦,等. 重组溶葡萄球菌酶在患子宫内膜炎奶牛体内的药代动力学与残留研究.疾病防治,2012, (2):40-44.
Lu JC,Chen HP,Ma HY, et al. Pharmacokinetics and residue of recombinant lysostaphin in dairy cows with endometritis. Disease Prevention, 2012, (2):40-44.